

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap histologi kelenjar mammae mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi 7,12-Dimetilbenz(α)Antrasen ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi:

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi yang berbeda, perlakuan yang digunakan adalah (K-) kontrol negatif, (K+) kontrol positif, (P1) 100 mg/kg BB, (P2) 150 mg/kg BB, (P3) 200 mg/kg BB dan (P4) 250 mg/kg BB serta konsentrasi 7,12-Dimetilbenz(α)Antrasen (DMBA) 20 mg/kg BB.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah histologi kelenjar mammae mencit meliputi tebal sel epitel dan diameter lumen duktus mammae serta tebal epitel dan diameter lumen alveoli mammae mencit (*Mus musculus*).

3. Variabel kendali jenis hewan uji yaitu mencit dengan strain balb/c, jenis kelamin betina, berumur ± 40 hari dan berat badan awal 18-20 gram yang diberi makan pelat dan diberi minum secara *ad libitum*

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Gambaran Histologi Kelenjar Mammae Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(α)Antrasen secara In Vivo ini dilakukan pada bulan Januari–April 2013 di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Biosistem jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) balb/c jenis kelamin betina yang berumur ± 40 hari dengan berat badan 18-20 gram. Banyak sampel yang digunakan adalah 24 ekor mencit betina yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan setiap kelompok terdiri dari 4 ekor mencit betina sebagai ulangan.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah erlenmeyer tutup 1000 ml, erlenmeyer vacuum 500 ml, beaker glass 500 ml, neraca analitik (ketelitian 0.0001 g), *syringe* 1 ml dan 3 ml, spatula, jerigen 1000 ml, pompa vakum, kertas saring, timbangan hewan (ketelitian 0,2), *vortex*, pinset, alat bedah, *hot plate* dengan *magnetic*

stirrer (untuk pengaduk), mikrotom, masker (sekali pakai), sarung tangan karet (sekali pakai), wadah silinder, jangka sorong (ketelitian 0.05 mm), komputer, oven, pengaduk, timbangan hewan, alat kebersihan, kantung sampah, botol minum mencit, tempat makan mencit, kandang mencit, rak kandang, kaca preparat, kaca penutup, kertas label, tissue dan mikroskop.

3.5.2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi mencit (*Mus musculus*) jenis kelamin betina yang berumur ± 40 hari dengan berat badan 18-20 gram dengan jumlah 24 mencit diperoleh dari peternak didaerah Wagil. Malang, Jawa Timur, Senyawa 7,12-Dimetilbenz(α)Antrasen (DMBA) diperoleh dari laboratorium Faal Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur, ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) diperoleh dengan mengekstraksi serbuk kering daun sirsak yang didapatkan dari materia medica, minyak jagung, sekam, pakan mencit (pelet), NaOH, Etanol destilat 70%, cloroform, formalin 10%, alkohol 50%, 70%, 80% dan 100%, larutan gelatin 0,5%, xylol, etanol absolut, paraffin, aquades, hematoxilin, eosin, larutan perak koloidal, chloroform, Na CMC 0,5% dan etelan.

3.6. Kegiatan Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dilakukan, terlebih dahulu mempersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba yang meliputi kandang, sekam kayu, tempat makan dan minum mencit, pakan mencit. Hewan coba yang berjumlah 24 ekor, selanjutnya diaklimatisasi selama 2 minggu, diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

3.6.2 Pembagian Kelompok Sampel

Selanjutnya setelah hewan coba telah di aklimatisasi. Mencit dipilih secara acak dan dikelompokkan menjadi 6 kelompok Perlakuan masing-masing berjumlah 4 ekor sebagai ulangan. Kelompok perlakuan dibagi sebagai berikut:

1. Kelompok 1 sebagai kontrol negatif (K-) yaitu kelompok yang diberikan pengencer ekstrak yaitu disonde 0,5 ml Na CMC 0,5% setiap hari selama 8 minggu sebanyak 0,5 ml dan pelarut DMBA yaitu minyak jagung 2 kali seminggu selama 6 minggu sebanyak 0,1 ml
2. Kelompok 2 sebagai kontrol positif (K+) yaitu kelompok mencit yang disonde Na CMC 0,5% sebagai pelarut ekstrak selama 8 minggu sebanyak 0,5 ml dan diinduksi Dimetilbenz (α) Antrasen 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu sebanyak 0,1 ml
3. Kelompok 3 (P1) yaitu kelompok mencit yang diinduksi Dimetilbenz (α) Antrasen sebanyak 0,02 mg/gram BB diberikan 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan disonde ekstrak daun sirsak sebanyak 100 mg/kg BB/hari + 0,5 ml Na CMC 0,5% selama 8 minggu
4. Kelompok 4 (P2) yaitu kelompok mencit yang diinduksi dimetilbenz (α) antrasen sebanyak 0,02 mg/gram BB diberikan 2 kali dalam seminggu selama 6 minggu dan disonde ekstrak daun sirsak sebanyak 150 mg/kg BB/hari + 0,5 ml Na CMC 0,5% selama 8 minggu
5. Kelompok 5 (P3) yaitu kelompok mencit yang diinduksi dimetilbenz (α) antrasen sebanyak 0,02 mg/gram BB diberikan 2 kali dalam

seminggu selama 6 minggu dan disonde ekstrak daun sirsak sebanyak

200 mg/kg BB/hari + 0,5 ml Na CMC 0,5% selama 8 minggu

6. Kelompok 6 (P4) yaitu kelompok mencit yang diinduksi dimetilbenz

(α) antrasen sebanyak 0,02 mg/gram BB diberikan 2 kali dalam

seminggu selama 6 minggu dan disonde ekstrak daun sirsak sebanyak

70 mg/kg BB/hari + 0,5 ml Na CMC 0,5% selama 8 minggu

Pemberian ekstrak daun sirsak sebagai pencegahan dilakukan secara oral setiap hari selama dua minggu pada tiap perlakuan kecuali kontrol positif dan kontrol negatif. Ekstrak daun sirsak diberikan pada mencit setiap pagi hari pukul 10.00-11.00 WIB. Selama perlakuan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Selanjutnya mencit diberikan DMBA selama 6 minggu pada siang hari pukul 13.00-14.00 WIB. Pemberian DMBA dilakukan seminggu 2 kali hari senin dan kamis yang dibarengi dengan pemberian ekstrak daun sirsak setiap hari.

3.6.3 Pembuatan ekstrak daun sirsak

Serbuk daun sirsak (*Annona muricata* L.) diperoleh dari Balai Materia Medica, Batu. Dalam proses pembuatan ekstrak daun sirsak, serbuk daun sirsak tersebut dimaserasi dengan menggunakan etanol 70% selama 24 jam. Pada proses maserasi ini sediaan diaduk dengan menggunakan *shaker*. Hasilnya disaring dengan pompa vakum dan corong buchner untuk mendapatkan filtratnya. Kemudian filtrat ditampung dan untuk proses penguapan pelarut daun sirsak dilakukan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai pelarut menguap, sehingga pada akhirnya diperoleh ekstrak yang kental. Hasil

yang diperoleh dari proses penguapan tersebut ditimbang dan disimpan dalam lemari pendingin sampai waktu perlakuan dilakukan.

3.6.4 Pembuatan Sediaan Larutan Na CMC 0,5%

Sediaan larutan Na CMC 0,5 % dibuat dengan menaburkan 500 mg Na CMC ke dalam 10 ml aquades panas, kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai jel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam labu ukur dengan aquades hingga volume 100 ml.

3.6.5 Pembuatan Sediaan 7,12-Dimetilbenz(α)Antrasen

Penyediaan Dimetilbenz(α)Antrasen diberikan pada konsentrasi 20 mg/kg BB yang telah dihomogenkan dengan minyak jagung, larutan DMBA disetiap pemberian memiliki konsentrasi 3 mg DMBA/mL dengan perbandingan DMBA dan minyak jagung 3:1. Pemberian DMBA setiap mencit dilakukan sebanyak 2 kali seminggu pada hari senin dan kamis. Senyawa DMBA diberikan pada mencit kontrol positif, P1, P2, P3, dan P4. Untuk kontrol negatif diberikan pelarut dari DMBA

3.6.6 Pengamatan Morfologi Hewan Coba

Pengamatan hewan coba dilakukan setiap hari pada masing-masing perlakuan dan ulangan. Dimulai dari awal penelitian sampai penelitian berakhir. Pengamatan morfologi hewan coba dilakukan untuk mengetahui adanya perubahan dari morfologi hewan coba selama perlakuan

3.6.7 Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Penimbangan hewan coba dilakukan seminggu sekali setiap hari pertama diawal minggu. Dimulai dari awal penelitian sampai penelitian berakhir. Penimbangan berat badan hewan coba dilakukan untuk mengetahui perubahan fluktuasi berat badan mencit selama penelitian

3.6.8 Pengambilan Sampel

Pembedahan dilakukan setelah 10 minggu masa perlakuan. Seluruh mencit dibius dengan kloroform, dibedah dan diambil mammae mencit untuk dibuat preparat mikroskop. Sediaan mikroskop mammae mencit diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali (10X10) dan 400 kali (40X10) lalu difoto.

3.6.9 Pembuatan Preparat Histologi

Mencit kelompok kontrol (-), kontrol (+) dan hasil perlakuan (Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan DMBA) pada minggu ke 10 dilakukan pembedahan diambil organ mammae mencit dilakukan pembuatan preparat sebagai berikut:

1. Tahap pertama *Coating*, dimulai dengan menandai objek glass yang akan digunakan dengan kikir kaca pada area tepi lalu direndam alkohol 70% minimal semalam, kemudian objek glass dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan gelatin 0,5% selama 30-40 detik per slide lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan sehingga gelatin yang melapisi kaca dapat merata.
2. Tahap kedua, organ mammae dan paru-paru yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam dilanjutkan

- dengan pencucian secara bertingkat dengan alkohol yaitu alkohol 90%, 95%, etanol absolut (3 kali) xylol (3 kali) masing-masing selama 20 menit.
3. Tahap ketiga adalah proses infiltrasi yaitu dengan menambahkan parafin 3 kali selama 30 menit
 4. Tahap keempat adalah *embedding* bahan beserta parafin dituangkan dalam kotak karton atau waddah yang sudah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap disekat bahan. Blok parafin disimpan selama semalam dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam *freezer* sehingga benar-benar keras.
 5. Tahap pemotongan dengan mikrotom. *Cutter* dipanaskan dan ditempelkan pada dasar balok sehingga parafin sedikit meleleh. *Holder* dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayatan dimulai dengan mengatur ketebalan, kemudian pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dimasukkan kedalam air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik, irisan yang terpilih diambil dengan *objek glass* yang sudah dicoating lalu dikeringkan diatas *hot plate*.
 6. Tahap *deparanisasi* yakni preparat dimasukkan dengan larutan dalam xylol sebanyak 2 kali 5 menit.
 7. Tahap dehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali) etanol 95%, 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam aquades selama 10 menit.

8. Tahap pewarnaan, preparat ditetesi dengan *hematoxilin* selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades selama 5 menit.
9. Tahap *dehidrasi*, preparat direndam dengan etanol 80%, 90% dan 95% dan etanol absolut (2 kali) masing-masing selama 5 menit.
10. Tahap *clearing* dalam larutan xylol 2 kali selama 5 menit kemudian dikeringkan.
11. *Mounting* dengan etilen hasil akhir akan diamati dengan mikroskop dan dipotret kemudian data dicatat.
12. Pemotretan preparat dalam pengamatan di mikroskop disajikan secara jelas.

3.6.10 Pengamatan Struktur Histopatologis Kelenjar Mammae Mencit (*Mus musculus*)

Pengamatan terhadap histopatologis mammae mencit (*Mus musculus*) diamati dibawah mikroskop komputer olympus tipe cx31 dengan menggunakan perbesaran 100 kali dan 400 kali pada lima lapang pandang meliputi tebal epitel dan diameter lumen dari duktus mammae dan alveoli mammae mencit. Nilai rata-rata tebal epitel duktus mammae dan alveoli mammae diperoleh dari pengukuran empat lokasi berbeda dengan menarik garis secara horizontal dan ventrikal pada tiap satu duktus mammae per lapang pandang dan dua alveoli mammae per lapang pandang yang dipilih secara acak. Sedangkan nilai rata-rata diameter lumen duktus mammae dan alveoli mammae mencit diperoleh dari dua kali pengukuran dengan menarik garis horizontal dan ventrikal pada tiap satu duktus mammae per

lapang pandang dan dua alveoli mammae per lapang pandang yang dipilih secara acak.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa rata-rata tebal epitel duktus mammae, tebal epitel alveoli mammae, diameter lumen duktus mammae dan diameter lumen alveoli mammae mencit (*Mus musculus*). Data tersebut kemudian dianalisis dengan ANOVA satu arah. Apabila dari hasil analisis diperoleh nilai $F_{hitung} > F_{tabel} (0,01)$ dilanjutkan dengan uji duncan.